生物技術在台灣果樹育種之應用

Biotechnology Applications in Taiwan's Fruit Breeding

李文立
by
Wen-Li, Lee

摘要

多樣化品種的育成是未來快速增加的人口與適應多變環境的方法，有效率益的育種技術將是未來農業的趨勢。傳統果樹育種方法利用實生選種，突變育種與雜交選育等方式進行，不僅受限於種原變異度大小，也因為不同物種（species）間的生殖隔離，使育種成果不易有重大突破。利用遺傳工程（genetic engineering）技術進行作物品種改良，可以將特定基因或性狀導入目標作物中，開啟了作物育種的新突破也促使作物生產發生變革。生物技術包括組織培養、基因工程、分子診斷及分子標誌等，其中以分子標誌輔助育種（Marker Assisted Selection, MAS）及診斷檢測領域為目前最受矚目且成長快速的研究方向。前者具有快速有效的數量性狀篩選優勢外，可以早期篩檢隱性基因及同時追蹤許數基因，使育種工作效率加速，減少田間培育與篩選勞力，是未來生物技術應用於果樹育種工作的顯學。後者在近年的研究計畫數快速成長，且應用廣泛。雖然在 2010 年全球分子標誌的研究中，果樹類（13%）遠比穀類（31%）低，且標誌種類以逢機擴大多型性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）為主，然而在新品種開發的需求下，分子標誌的總體研究數量呈現成長趨勢。

關鍵字：生物技術、果樹、育種、應用、趨勢
Key words: biotechnology, fruit tree, breeding, applications, future

前言

全球人口的快速成長，氣候變化日趨劇烈，全球化的單一市場及作物生產環境快速改變，多樣化品種的育成是適應多變環境的不二法門，快速有效益的作物育種技術將會是影響未來農業的趨勢。對於多年生、世代長且耗時費工的果樹育種工作更需要引入新而有效益的方法以提升其育種效率。傳統果樹育種方法利用實生選種，突變育種與雜交選育等方式進行，不僅受限於種原變異度大小，也因為不同物種（species）間的生殖隔離，使育種成果不易有重大突破。利用遺傳工程（genetic engineering）技術進行作物品種改良，可以將特定基因或性狀導入目

行政院農委會農試所鳳山熱帶園藝試驗分所

標作物中，開啟了作物育種的新突破也促使作物產業發生重大改變。自基改作物上市以來，栽培面積不斷增加，至 2011 年全球已有 29 個國家大規模生產基改作物，總生產面積約 1.5 億公頃，為「綠色革命」以來，最重大的農業改變。現今所稱的生物技術包括組織培養、基因工程、分子診斷及分子標誌等，其中以分子標誌輔助育種（Marker Assisted Selection, MAS）為目前最受矚目的應用方向，除了快速有效的數量性狀篩選優勢外，早期篩檢及隱性基因確認等優勢可使育種工作加速，減少大量的田間培育與篩檢勞力，將會是未來生物技術應用於果樹育種工作的顯學。雖然在 2010 年全球分子標誌的研究中，果樹類（13%）遠比穀類（31%）低，且標誌種類以逢機擴大多型性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）為主，然而在新品種開發的需求下，分子標誌的總體研究數量呈現成長趨勢。展望未來，透過生物技術運用於作物育種的方向不僅廣泛應用於基改新作物的發展，而且分子標誌將加速不同種類果樹新品種的開發，以因應市場對時新品種的需求。

生物技術在果樹之應用

「生物技術」是一門應用科學。廣泛的定義可以指經由人為操作的方式，控制生物生長、發育、繁殖或生變異等現象的技術。狹義的生物技術則被定義為利用組織培養、基因工程及基因移轉等現代分子生物技術，進行生物品種改良及生產改進的技術。由於生物技術可應用的範圍廣泛，包含了食品、環保、醫療及農、林、漁、牧等產業，深刻影響人類生活，被認為是極具發展潛力的新科技（蔡等人，2007-10），全球各先進國家近年都積極投入研發。「綠色革命」之後至今，隨著作物生產技術的發展進步，現今農作物的產量提升有限，而全球人口的成長使糧食安全問題成為各國重視的議題。如何提升作物的生產量、增加作物對環境的耐受性、改善作物品質或使其能更合於貯運，減少作物因為病蟲害而造成的損失，是利用生物技術改進作物生產的重要議題。

傳統的果樹育種方法為利用實生選種，突變篩選與雜交選育等方式進行，其中以實生選種與雜交選育較為常用，這兩種方式均將兩親本所有好壞的基因型及性狀合併遺傳給子代，育種工作者必須在數量龐大的後代族群中去蕪存菁，將表現優良的後代保留繁殖或繼續雜交選拔以獲得理想性狀（基因型），就此育種方式而言，不僅受限於種原變異度大小，也因為不同物種（species）間的生殖隔離，二親本所沒有的性狀無法出現在雜交後代中，使育種成果不易有重大突破。利用遺傳工程（genetic engineering）技術進行作物品種改良，可以將特定基因或性狀導入目標作物中，開啟了作物育種的新突破也促使作物產業發生巨大的改變。

生物技術在農業上的應用廣泛，在果樹產業上大致可以區分如下：

I. 組織培養：苗木繁殖與種原維持

生物技術在園藝上應用最廣的是組織培養與微體繁殖。組織培養應用在大量

種苗的繁殖與健康種苗生產體系已經在許多種類的作物被開發出來，除了在台灣有許多業者投入組織培養生產種苗的行列，也漸漸成為種苗生產的主流技術，在果樹種苗生產上應用較廣的有香蕉、鳳梨與木瓜的種苗生產（圖 1）、百香果無病毒種原的保存（圖 2）及柑橘去病毒種原的保存與無病毒苗生產。以柑橘為例，其具體作法為利用柑橘微體嫁接法(micrografting)，將極小的莖尖(0.14－1.0mm)作為接穗，嫁接到不帶病毒的種子實生苗砧木上，然後將砧木、接穗一起在培養基上培養。在此無菌環境下，加上提供充足適當的營養，接穗在砧木上容易成活，且去除病毒機率大，故能獲得無病毒苗。目前已知微體嫁接技術，已應用在蘋果、柑橘、桃等果樹的無病毒苗的取得，對於其他果樹，此技術具有同樣獲得無病毒種苗的潛能。組織培養技術不僅可以快速增加苗木數量，也節省了許多繁殖的時間，也是進行基因槍、農桿菌等基因轉殖法及細胞融合、微體嫁接與低溫冷凍保存等技術的必須先期技術，也是進行基因工程的一項重要基礎。

圖 1、利用組織培養進行優良香蕉品種的大量繁殖。

圖 2、百香果無病毒種原利用組織培養進行種原保存。

II. 基因工程：品種創新與環境適應

遺傳工程（genetic engineering）技術，是指將生物體內（*in vivo*）分離，或在生物體外（*in vitro*）改造之特定基因（gene），利用基因轉移技術（gene transfer techniques）導入缺乏此一基因目標作物（target crop）的育種方法。一般而言，因為是將特定基因的嵌入（insert），所以每次轉移的基因僅能將一個，或少數基因導入目標作物的染色體組，與雜交育種過程中整個基因組（genome）的合併並不相同。利用基因工程方式可以針對特定需要修正或增加的基因給予改變，可以避免雜交育種過多基因同時轉移，好壞性狀參雜造成的遺傳拖迆(genetic drag)現象導致所欲改良之性狀，不易固定、純化，或與其它不良性狀連鎖，極易於育種過程遺失等缺點。利用基因工程方式獲得的作物品種，稱為遺傳修飾作物（genetically modified crops, GMCs）或轉基因作物（transgenic crops）。基因工程為進行核酸物質操作的一種方式，主要的技術包括，1.基因操作（Gene manipulation)；2.基因重組技術(Recombinant DNA technology)；3.基因選殖(Gene cloning; molecular cloning）其操作通常包含 3 個主要步驟：1.鑑別與分離合適的基因（圖 3)；2.開發或選擇適當的基因轉移系統；3.適當表達的新轉殖基因（圖

行政院農業委員會農業試驗所藏書

4)，全球最早開發進行商業生產的基改果樹為木瓜，目前在夏威夷生產面積約有350 公頃，也銷往美洲各國（圖 5）。

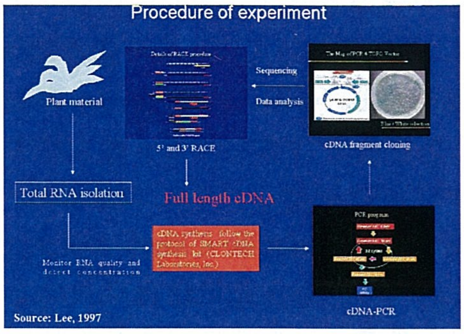


圖 3、PCR 與基因選殖為分離與鑑定基因的常用方式（Lee, 1997）。

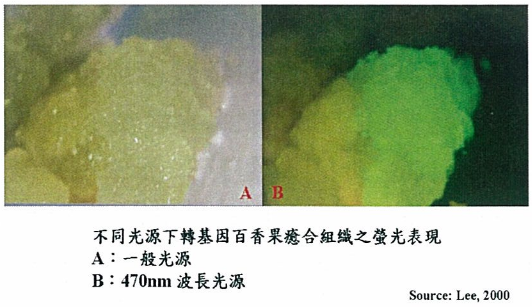


圖 4、利用綠色螢光蛋白作為指示基因可以用方破壞性方式進行偵測（Lee, 2000）。

圖 5、基因改造木瓜對於木瓜輪點病毒病具有良好抗性，在露天生產時可以獲得高產量（包等人，2007）。

III. 分子診斷：減少損失與種苗健康

台灣地處熱帶與亞熱帶，氣候高溫多濕，為許多病蟲害的溫床，常常在颱風豪雨後發生嚴重的病害，造成農民嚴重的經濟損失，對於要如何降低病蟲害造成的損失，其防治策略以預防為主—先期檢測。對於許多病原的確定與診斷大致可以分成依「柯霍氏法則」將病菌純化培養後再回接的傳統方式及簡便、快速、精準與高靈敏的生物技術方式。

依據檢測原理的不同，生物技術檢測方式又可以分為「血清抗體」與「核酸檢測」兩類(圖6；鄧, 2011)。利用「血清抗體」開發之分生技術最常用的為ELISA、晶片及反應試紙等方式；「核酸檢測」則需要限制酶切割、雜合反應、PCR增量與電泳染色，常用的方式為墨點法、電泳膠片及生物晶片。與傳統方法相比，分生技術的優點為流程操作需時較短、客觀，缺點為價格高昂、無法獲得活體、無法檢測新的病原；而血清抗體法與核酸探針法兩者相比（圖7；李與王, 2011），前者較便宜、快速、簡便，而後者精準度較高，但價格最為昂貴（安與蔡, 2009

07)。國內目前也利用RT-PCR技術進行果樹中菌質體感染的研究，利用專一性的引子條帶進行分析媒介昆蟲與果樹，目前已經應用於木瓜、芒果與蓮霧之菌質體分析（圖8；黃, 2011)。因為基因轉殖作物在全球種植面積甚廣，基因轉殖作物的生物安全性，一直是全球爭論的議題，美國夏威夷地區因為商業生產基因改造木瓜，同時也出口非基改木瓜至日本，因此所有欲外銷的木瓜果園必須進行逐株檢測，雖然採用GUS染色方式可以縮短檢測時間，其檢測成本達每株1元美金，也成為生產上的另一項負擔（圖9；李等人, 2008）。為防止基因轉殖植物對生態環境及人類健康產生負面之影響，世界各先進國家均訂定基改生物安全評估與管理制度，期能有效管理基因轉殖作物，所有基因轉殖作物品系於正式核准在一般田間栽培與生產前需接受生物安全性評估，產品上市後除需標示屬基因轉殖作物生產外，亦對該產品進行長期追蹤管理，台灣在因應此一全球趨勢時下也成立基因轉殖作物檢測監測團隊，進行國內基改作物的檢測與監測工作（沈等人, 2006），除了利用PCR的方式進行基改作物的檢測外，國內也有許多研究人員進行簡化檢測流程的技術開發，以期能夠開發大量、簡便及經濟的新技術（圖10，Lee, 2007）。

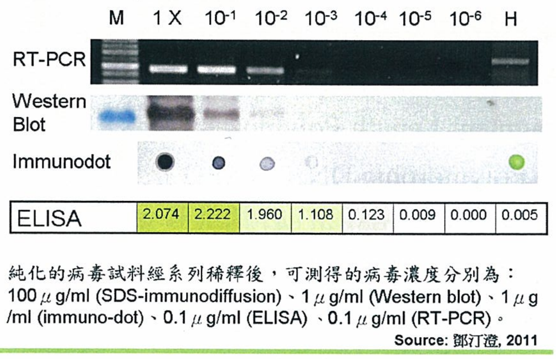
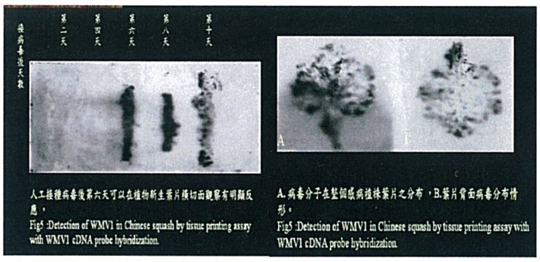


圖 6、不同的檢驗方式具有不同的敏感度，可以依照實際需求選擇不同的方式進行檢測（鄧, 2011）。



Source: Lee & Wang, 2001 (9)

圖 7、組織轉印法可以將欲檢驗的組織直接壓印在硝化纖維膜上再攜回實驗室利用核酸探針進行檢測，也可用於分析病毒在葉片的分佈情形（Lee & Wang 2001）。

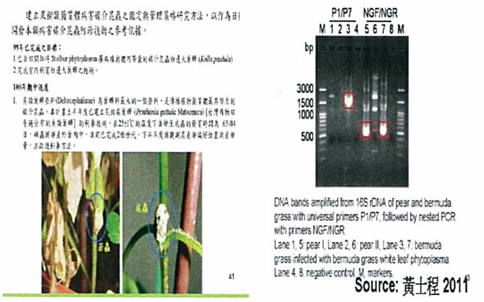


圖 8、果樹類菌質體病害媒介昆蟲之鑑定已經應用於蓮霧、芒果及木瓜菌質體檢測（黃 2011）

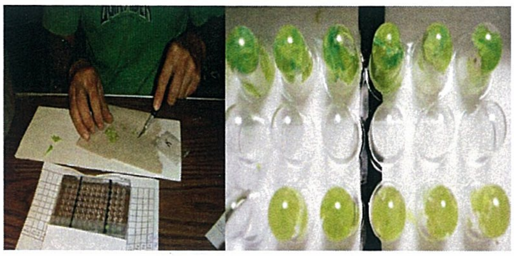


圖 9、夏威夷因生產基因改造木瓜使外銷至日本的木瓜需利用 GUS 染色方式在集貨場進行檢測（Lee, 2008）

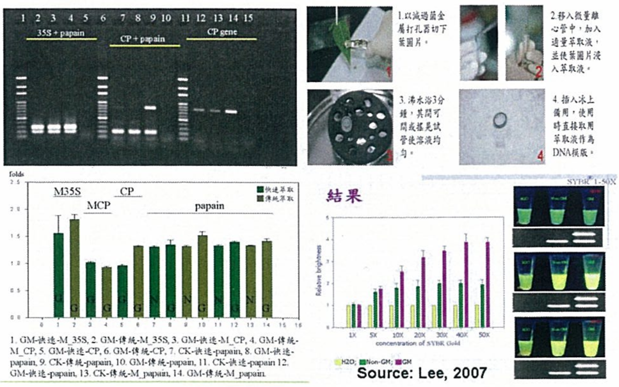


圖 10、基改木瓜檢測常採用 PCR 方式，若配合 DNA 快速萃取方式則可以節省許多檢測時間（Lee, 2006）。

IV. 分子標誌：加速育種與減少人力

自1970年代晚期，DNA為主的分子標誌開始被發展，科學家開始針對特定物種進行DNA標誌的開發，並利用這些標誌偵測與目標性狀的關聯，以輔助傳統育種的型態選拔方式進展為基因型的選拔方式。分子標誌依照依照個體間分子層次的改變，包括突變、插入、置換、缺失等差異性進行選拔。常見的分子標誌包括限制片段長度多型性（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）、隨機增幅多型性DNA（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）、增幅片段長度多型性（Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP）、單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism, SNP）及簡單重複序列多型性（simple sequence repeats or microsatellile, SSRs）等，還包含由這些分子標誌系統衍伸出來，有包含PCR 與RFLP 兩項技術的限制酵素切割擴增片段多型性（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS）以及將RAPD或AFLP 方式產生出的DNA 條帶進行回收與定序的序列特徵化增幅區域（Sequence Characterized Amplified Region,SCAR）等標誌。這些標誌被應用於加速新品種選育（圖11 Lee et al, 2011及圖12 Chen et al.,2007）與不同品種間親緣關係分析或自交後代的早期篩檢（圖13 Lee et at., 2007 及 Lee et al., 2009）。

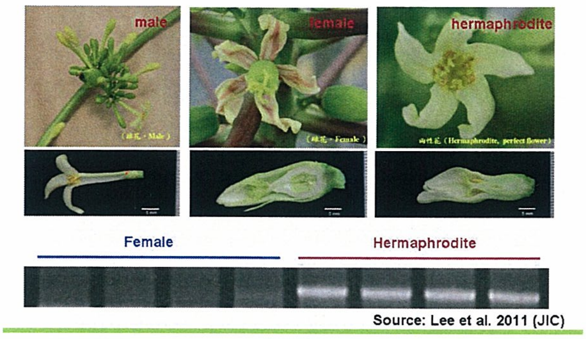


圖 11、番木瓜利用性別標誌進行早期篩檢，可以在開花前減少 2/3 的田間照護工作。

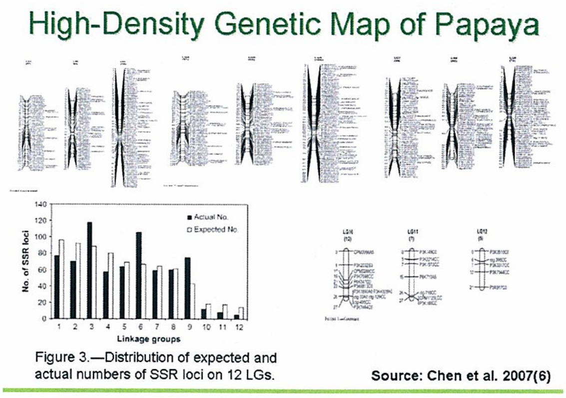


圖 12、木瓜因為全基因組解序，已經發展出數量眾多的 SSR 標誌。

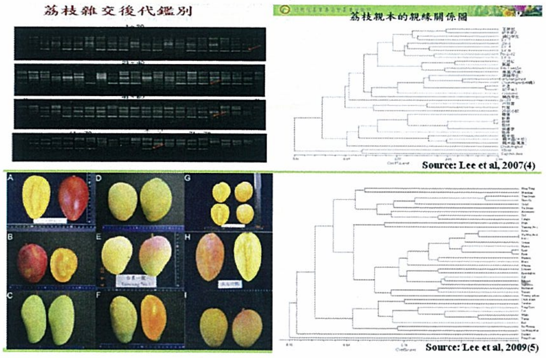


圖 13、利用分子標誌進行荔枝雜交後代的早期篩檢及芒果不同品種間親緣分析。

台灣生物技術研究現況

台灣的農業技術已經具有相當優異的研發基礎，也有「農業生物技術國家型科技計畫」來推動橫跨部會署間的研發能量，由於全球對生物技術研究的積極投入，並認為生物技術是解決未來農業生產問題的一個良好工具。台灣在農業生物技術領域也投入不少的經費，依據農委會 2011 年統計數字指出，在農業領域的生物技術研究經費約 21 億新台幣，共有 342 個計畫項次，依據研究領域的不同可以區分為：植物種苗生技、動物用疫苗、畜禽生物技術、食品生物技術、檢測診斷技術、生物性農藥、水產養殖生物技術、生物性肥料及其他農業生技等 9 個領域。其中植物種苗生技領域的計畫數（121 個）與使用經費（6.3 億）為最多，分別佔總計畫數的 35%及總經費 30%，其次為檢測診斷技術領域計畫數(77 個)，使用經費為 3.5 億，分別佔總計畫數的 22%及總經費的 17%。若比較 2001 及 2011 年研究計畫數與經費使用情形，可以瞭解在這 10 年的變化情形，其中以其它農業生技的研究減少明顯，從 20 個計畫數減成 0 個，水產養殖生技與食品生技同樣減少約 50%的計畫數，植物種苗生技持平，成長最快速的研究領域為診斷檢測

領域，成長幅度達 3.5 倍（從 22 個計畫增加至 77 個計畫），研究經費的成長達 22 倍（從 29,497 千元成長至 355,413 千元）。顯示在台灣的農業生物技術研究方向已經有大幅度的改變（圖 15 及 16），而植物種苗生技與檢測診斷領域為目前較受矚目的研究方向。

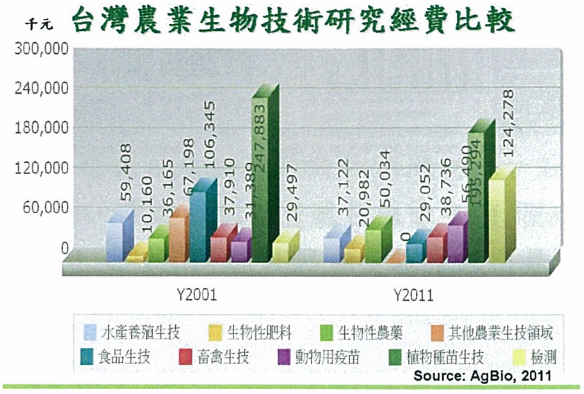


圖 14、台灣農業生物技術研究經費歷年來變化。

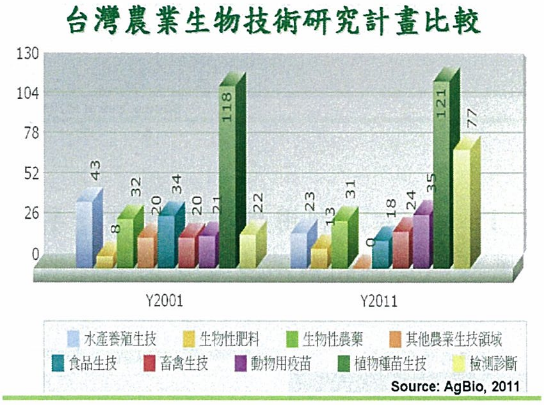


圖 15、台灣農業生物技術研究計畫數比較。

未來展望

由於生物技術對於未來農業具有深遠的影響，又能衍生到醫療保健、能源與工業用途基，目前全球已有29個國家大規模生產基改作物，總生產面積約1.5億公頃（圖16）。ISAAA評估在未來仍會以每年10%的比例持續增加，預計至2015年，基改大豆與基改棉花仍將是發展重點，而稻米、馬鈴薯、小麥、番茄等作物有機會進入商業生產。此外，由於生物技術的快速發展，基因定序效率的大幅提昇，果樹基因組序列的資訊快速增加，根據NCBI資料庫2011年資訊，已經被解序的果樹種類計有木瓜（*Carica papaya*）、蘋果（*Malus domestica*）、草莓（*Fragaria vesca x Fragaria nubicola*）、樹莓（*Rubus idaeus*）、葡萄（*Vitis vinifera*）、香蕉（*Musa acuminata*）、杏仁（*Prunus dulcis*）、橙（*Citrus sinensis*）及桃（*Prunus persica*）等。由於各種果樹的序列資料增加，產業上又需要新的果樹品種投入，在有足夠可用之基因標記的前提下，分子標誌將成為一個重要的育種輔助工具，此育種方式具有：1.數量性狀篩選的優勢，對傳統育種方式不易篩選出最佳表現的品系，特別是抗蟲抗病的性狀，可以利用分子標誌直接偵測此群基因以確定所篩選之品系具有該群基因。2.節省田間種植等待時間，分子標誌可以儘早確定該品種是否具有目標性狀，在生長世代長的果樹育種上，更具有優勢。3.隱性基因的早期剔除，在傳統育種工作中，需於F2才能確認是否帶有隱性基因，利用分子標誌可以直接偵測，無須等待F2族群。4. 分子標誌可以同時篩選不同的目標性狀，減少田間繁雜的栽培管理、檢驗記錄等工作，增進效率。若所進行之育種計畫需同時針對數種性狀進行選拔，且多數重要的園藝性狀為數量性狀，分子標誌更能發揮

其功效，成為一個相當重要的輔助工具（圖17；Morris *et al*., 2003）。為了加速果樹新品種選育，分子標誌輔助育種將會更廣泛的被應用。此外，在生物技術的領域中雖然分子標誌與診斷檢測是近年來成長較多的研究方向，然而因為果樹生理特性的緣故，許多重要果樹品種的組織培養技術尚未建立，在需要進行果樹基因工程，轉移其它物種基因進入目標果樹種類時將會是一個瓶頸。又因為生物技術研究需較多的研究經費，資源分配是研究計畫成功與否的重要關鍵。在果樹生物技術研究工作上，應選定具有潛力的果樹品種深入進行研究開發，並長期穩定的投入經費與人力，以獲得更多的研發成果，進而促進果樹產業的提升。

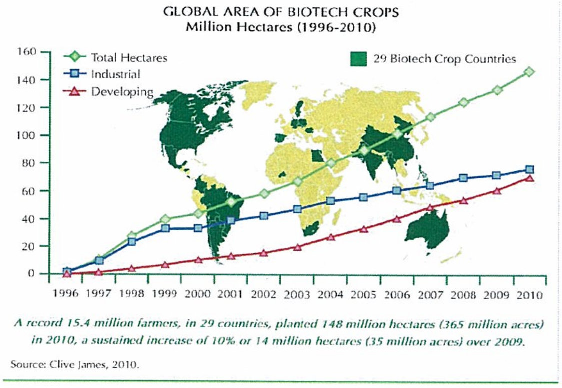


圖 16、2011 年全球基改作物種植國家有 29 個，面積廣達 1.5 億公頃（Clive, 2010）。

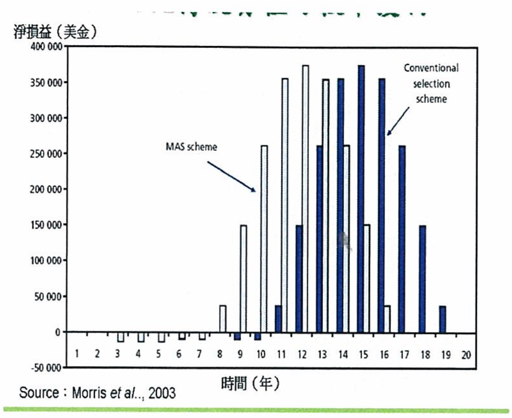


圖 17、利用分子標誌輔助育種可以提早獲得育種成果（Morris et al., 2003）。

參考文獻

1. 朱鴻鈞、余祁暐，2010，分子育種（MAS）全球發展現況與趨勢，2010 農業生技產業趨勢研討會 pp1:10。
2. 沈翰祖、陳駿季、邱展台、羅致逑、李文立、張隆仁、林新強、楊藹華、王雲平、陳富永、王啟正、方　繼、郭寶錚、包慧俊。 2006 基因轉殖作物檢測監測體系之建立。農業生技產業季刊。第五期 p35-40。
3. 李文立 1997 臺灣原生鐵炮百合及臺灣百合形態調查與 RAPD 多型性分析. 國立台灣大學碩士論文 臺灣台北.
4. 李文立、王德男。1999 聚合脢鍊鎖反應（PCR）於瓜類病毒之偵測. 技術服務。39 期 p22-25.
5. 李文立。 2000 百香果農桿菌轉基因系統之建立。中國園藝 46(4):509。
6. 李文立、王德男 2001 核酸探針在瓜類病毒偵測之應用。中國園藝 47(4)：456。
7. 李文立、王德男。 2006 木瓜基因組 DNA 快速萃取技術之開發與轉基因作物檢測技術之建立。木瓜產業發展研討會專刊 P79-93。

8. 李文立、鄧永興、林榮貴。2007。應用 RAPD 技術對荔枝品種遺傳變異性之研究。台灣農業研究 56(4): 281-288。
9. 李文立。2009。夏威夷木瓜產業概況。農業試驗所技術服務 78: 13-15。
10. 李文立、邱國棟、翁一司。2009。芒果種原親緣關係之研究。台灣農業研究 58（4）: 243-253。
11. 李文立。2010。雄花?雌花?傻傻「長」不清楚: 番木瓜的花性變化。園藝之友 137: 24-27。
12. 吳明哲，2010，分子標誌在蔬菜種子之研發與應用。農業生技產業季刊 No. 21: 18-22.
13. 許嘉伊 2010 全球生物農藥產業概況與未來展望 農業生技產業專刊 24(7)
14. 蔡奇助、曾東海、王強生 2002. 基因工程與作物品種改良. 亞熱帶農作物產業之研究發展研討會專刊.p. 166-182.
15. Chen C., Q. Yu, S. Hou, Y. J. Li, M. Eustice, R. L. Skelton, O. V. Rachel, E. Herdes, L. Diebold, J. Saw, Y. Feng, W. Qian, L. Bynum, L. Wang, P. H. Moore, R. E. Paull, M. Alam and R. Ming. 2007. Construction of a Sequence-Tagged High-Density Genetic Map of Papaya for Comparative Structural and Evolutionary Genomics in Brassicales. Genetics 177:2481-2491.
16. James, C., 2011, ISAAA report on global status of biotech/GM crops, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, http://www.isaaa.org.
17. Lee, W. L., C. C., Chiou, and C. F., Hong. 2011. Sex type identification in papaya (Carica papaya L.) by Ramdom Amplification Polymorphic DNA. J. International Cooperation 6(1): 17-26.
18. Morris, M.L., Ribaut, J-M., Dreher, K. & Khairallah, M. 2003. Money matters (II): Costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. Mol. Breeding 11: pp 235-247.